本製品における 6 日目の検量線の作成記録は，以下に示すとおりである。

表 5.1.17　「日間再現性試験6日目」検量線用標準溶液の測定データ

項目		単位	検量線用標準溶液				
			ﾌﾞﾗﾝｸ	溶液 STD1	溶液 STD2	溶液 STD3	溶液 STD4
所定濃度		μg/L	0	1.5	3	15	30
実測回数		回	3	3	3	3	3
ELISA 実測 B/B0*	1	－	1.039	0.766	0.608	0.243	0.146
	2	－	1.014	0.708	0.592	0.242	0.137
	3	－	0.947	0.708	0.588	0.242	0.137

* 添付標準 0μg/L の平均吸光度を B0 とした。

表 5.1.18　採用した回帰式係数[Y = D + (A - D)/(1 + (X / C)^B]

回帰式の係数	A	B	C	D	R^2
値	1.00	1.16	3.45	0.0885	－

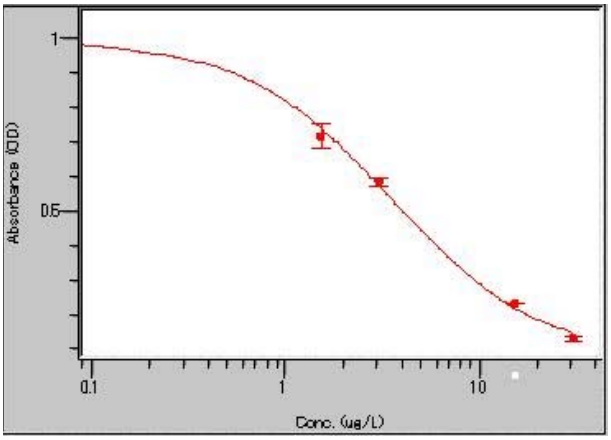

図 5.1.6　検量線

② 試験結果記録

本製品における対象物質の測定データは，以下に示すとおりである。

表 5.1.19 「日間再現性試験」対象物質試料溶液の測定データ

項目			単位	試験用試料溶液											
				溶液 S1			溶液 S2			溶液 S3			溶液 S4		
				1日	4日	6日	1日	4日	6日	1日	4日	6日	1日	4日	6日
調製濃度			μg/L	1.5	1.5	1.5	3	3	3	15	15	15	30	30	30
実測回数			回	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
ELISA実測 B/B0*	吸光度	1	—	0.751	0.736	0.739	0.592	0.613	0.615	0.240	0.264	0.259	0.135	0.144	0.144
		2	—	0.760	0.728	0.744	0.592	0.581	0.602	0.243	0.272	0.250	0.142	0.143	0.137
		3	—	0.731	0.700	0.711	0.614	0.593	0.608	0.250	0.264	0.247	0.147	0.143	0.140
		平均	—	0.747	0.721	0.731	0.600	0.596	0.608	0.244	0.267	0.252	0.142	0.143	0.140
	換算値		μg/L	2.08	1.62	1.63	3.68	2.72	2.70	16.6	11.4	12.8	54.1	39.2	38.9
平均			μg/L	1.78			3.03			13.6			44.1		
標準偏差			μg/L	0.27			0.56			2.66			8.69		
変動係数			%	14.9			18.4			19.6			19.7		

* 添付標準 0μg/L の平均吸光度を B0 とした。

評 価

同一週の 3 日間に測定した場合の変動係数は，調整濃度 1.5μg/L で 14.9%，3μg/L で 18.4%，15μg/L で 19.6%，30μg/L で 19.7%となり，いずれも 20%以下であった。日間再現性は概ね良好と判断される。ただし，高濃度側 30μg/L の相対値を求めると 147%と大きく，留意する必要がある。

(5) 期間再現性

① 検量線作成記録

本製品における最初の検量線の作成記録は，以下に示すとおりである。

表 5.1.20 「期間再現性試験最初」検量線用標準溶液の測定データ

項目		単位	検量線用標準溶液				
			ﾌﾞﾗﾝｸ	溶液 STD1	溶液 STD2	溶液 STD3	溶液 STD4
所定濃度		μg/L	0	1.5	3	15	30
実測回数		回	3	3	3	3	3
ELISA 実測 B/B0*	1	－	1.085	0.859	0.703	0.282	0.164
	2	－	0.981	0.763	0.665	0.268	0.157
	3	－	0.934	0.783	0.615	0.273	0.158

* 添付標準 0μg/L の平均吸光度を B0 とした。

表 5.1.21 採用した回帰式係数[Y = D + (A - D)/(1 + (X / C)^B]

回帰式の係数	A	B	C	D	R^2
値	1.00	1.27	4.33	0.107	－

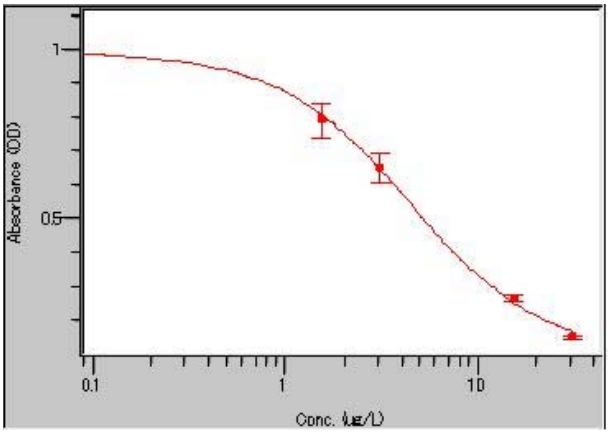

図 5.1.7 検量線

本製品における 1 ヶ月目の検量線の作成記録は，以下に示すとおりである。

表 5.1.22　**「期間再現性試験1ヶ月目」検量線用標準溶液の測定データ**

項目		単位	検量線用標準溶液				
			ﾌﾞﾗﾝｸ	溶液 STD1	溶液 STD2	溶液 STD3	溶液 STD4
所定濃度		μg/L	0	1.5	3	15	30
実測回数		回	3	3	3	3	3
ELISA 実測 B/B0*	1	－	1.043	0.771	0.610	0.241	0.150
	2	－	0.958	0.720	0.573	0.235	0.143
	3	－	0.998	0.718	0.581	0.232	0.141

* 添付標準 0μg/L の平均吸光度を B0 とした。

表 5.1.23　**採用した回帰式係数**[Y = D + (A - D)/(1 + (X / C)^B]

回帰式の係数	A	B	C	D	R^2
値	1.00	1.21	3.32	0.101	－

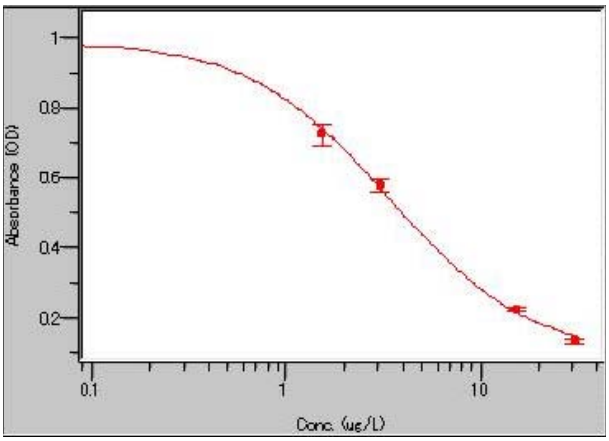

図 5.1.8　**検量線**

② 試験結果記録

本製品における対象物質の測定データは，以下に示すとおりである。

表 5.1.24 「期間再現性試験」対象物質試料溶液の測定データ

項目			単位	試験用試料溶液									
				溶液 S1		溶液 S2		溶液 S3		溶液 S4			
				最初	1ヶ月	最初	1ヶ月	最初	1ヶ月	最初	1ヶ月		
調製濃度			μg/L	1.5	1.5	3	3	15	15	30	30		
実測回数			回	3	3	3	3	3	3	3	3		
ELISA実測 B/B0*	吸光度	1	－	0.751	0.759	0.592	0.643	0.240	0.250	0.135	0.135		
		2	－	0.760	0.748	0.592	0.596	0.243	0.242	0.142	0.135		
		3	－	0.731	0.722	0.614	0.610	0.250	0.241	0.147	0.134		
		平均	－	0.747	0.743	0.600	0.616	0.244	0.244	0.142	0.135		
	換算値		μg/L	2.08	1.56	3.68	2.60	16.6	13.1	54.1	48.4		
平均			μg/L	2.09	1.56	3.68	2.61	16.6	13.1	55.0	48.4		
標準偏差			μg/L	0.13	0.13	0.16	0.23	0.61	0.40	8.12	0.89		
変動係数			%	6.5	8.5	4.4	9.0	3.7	3.0	14.8	1.8		

* 添付標準 0μg/L の平均吸光度を B0 とした。

評 価

1ヶ月を隔てて 2 回測定した場合の変動係数は，調整濃度 1.5μg/L で 6.5%→8.5%，3μg/L で 4.4%→9.0%，15μg/L で 3.7%→3.0%，30μg/L で 14.8%→1.8%となり（いずれも，矢印前は最初，後は 1ヵ月後），いずれも 20%以下であった。したがって期間再現性は概ね良好と判断される。ただし，高濃度側 30μg/L の相対値を求めると 183%および 161%と大きく，留意する必要がある。

(6) プレート間再現性

① 検量線作成記録

本製品におけるプレート A の検量線の作成記録は，以下に示すとおりである。

表 5.1.25　**「プレート間再現性試験プレートA」検量線用標準溶液の測定データ**

項目		単位	検量線用標準溶液				
			ﾌﾞﾗﾝｸ	溶液 STD1	溶液 STD2	溶液 STD3	溶液 STD4
所定濃度		μg/L	0	1.5	3	15	30
実測回数		回	3	3	3	3	3
ELISA 実測 B/B0*	1	－	1.046	0.753	06.21	0.254	0.155
	2	－	1.029	0.716	0.612	0.252	0.148
	3	－	0.925	0.711	0.575	0.238	0.151

* 添付標準 0μg/L の平均吸光度を B0 とした。

表 5.1.26　**採用した回帰式係数**[Y = D + (A - D)/(1 + (X / C)^B]

回帰式の係数	A	B	C	D	R^2
値	1.00	1.17	3.42	0.101	－

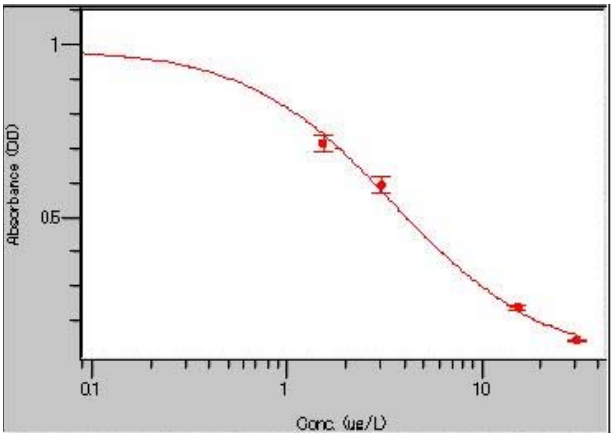

図 5.1.9　**検量線**

本製品におけるプレート B の検量線の作成記録は，以下に示すとおりである。

表 5.1.27　**「プレート間再現性試験プレート**B**」検量線用標準溶液の測定データ**

項目		単位	検量線用標準溶液				
			ﾌﾞﾗﾝｸ	溶液 STD1	溶液 STD2	溶液 STD3	溶液 STD4
所定濃度		μg/L	0	1.5	3	15	30
実測回数		回	3	3	3	3	3
ELISA 実測 B/B0*	1	－	1.052	0.782	0.599	0.243	0.144
	2	－	1.002	0.734	0.581	0.233	0.137
	3	－	0.945	0.730	0.573	0.237	0.141

* 添付標準 0μg/L の平均吸光度を B0 とした。

表 5.1.28　**採用した回帰式係数**[Y = D + (A - D)/(1 + (X / C)^B]

回帰式の係数	A	B	C	D	R^2
値	1.00	1.22	3.37	0.0968	－

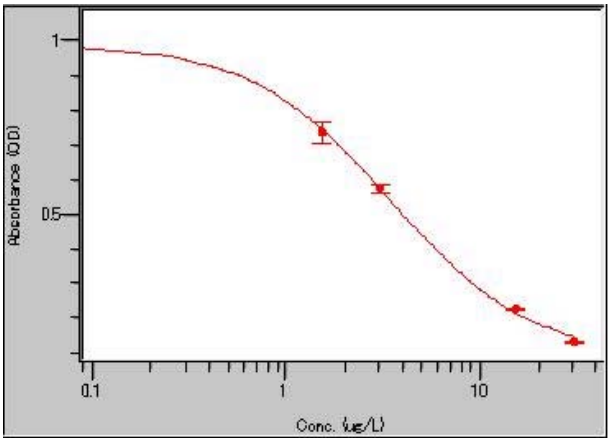

図 5.1.10　**検量線**

本製品におけるプレート C の検量線の作成記録は，以下に示すとおりである。

表 5.1.29　**「プレート間再現性試験プレートC」検量線用標準溶液の測定データ**

項目		単位	検量線用標準溶液				
			ﾌﾞﾗﾝｸ	溶液 STD1	溶液 STD2	溶液 STD3	溶液 STD4
所定濃度		μg/L	0	1.5	3	15	30
実測回数		回	3	3	3	3	3
ELISA 実測 B/B0*	1	－	1.046	0.766	0.632	0.248	0.166
	2	－	0.991	0.713	0.578	0.252	0.153
	3	－	0.963	0.700	0.583	0.234	0.161

* 添付標準 0μg/L の平均吸光度を B0 とした。

表 5.1.30　**採用した回帰式係数**[Y = D + (A - D)/(1 + (X / C)^B]

回帰式の係数	A	B	C	D	R^2
値	1.00	1.20	3.26	0.116	－

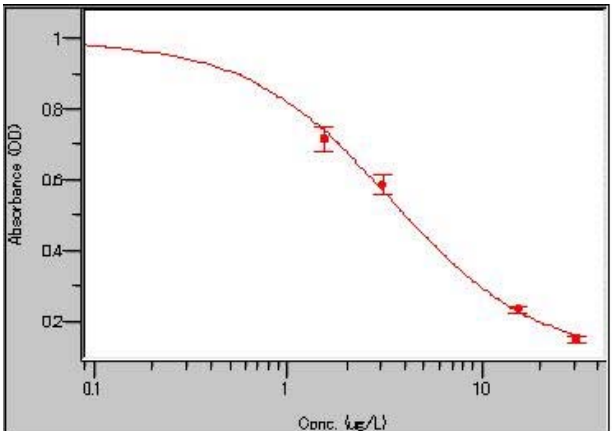

図 5.1.11　**検量線**

② 試験結果記録

本製品における対象物質の測定データは，以下に示すとおりである。

表 5.1.31　**「プレート間再現性試験」対象物質試料溶液の測定データ**

項目			単位	試験用試料溶液											
				溶液 S1			溶液 S2			溶液 S3			溶液 S4		
				ﾌﾟﾚｰﾄ A	ﾌﾟﾚｰﾄ B	ﾌﾟﾚｰﾄ C	ﾌﾟﾚｰﾄ A	ﾌﾟﾚｰﾄ B	ﾌﾟﾚｰﾄ C	ﾌﾟﾚｰﾄ A	ﾌﾟﾚｰﾄ B	ﾌﾟﾚｰﾄ C	ﾌﾟﾚｰﾄ A	ﾌﾟﾚｰﾄ B	ﾌﾟﾚｰﾄ C
調製濃度			μg/L	1.5	1.5	1.5	3	3	3	15	15	15	30	30	30
実測回数			回	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
ELISA実測 B/B0*	吸光度	1	－	0.751	0.758	0.770	0.627	0.626	0.645	0.273	0.271	0.262	0.144	0.142	0.136
		2	－	0.754	0.743	0.694	0.624	0.623	0.597	0.266	0.258	0.248	0.143	0.143	0.138
		3	－	0.723	0.706	0.712	0.601	0.570	0.578	0.267	0.254	0.246	0.141	0.135	0.132
		平均	－	0.743	0.736	0.725	0.617	0.607	0.607	0.269	0.261	0.252	0.143	0.140	0.135
	換算値		μg/L	1.56	1.63	1.68	2.65	2.73	2.71	12.1	11.6	13.5	45.5	39.0	77.3
平均			μg/L	1.63			2.70			12.4			53.9		
標準偏差			μg/L	0.059			0.041			0.99			20.5		
変動係数			%	3.6			1.5			8.0			38.1		

プレート A，B は同一ロット，プレート C は異ロット。
* 添付標準 0μg/L の平均吸光度を B0 とした。

評　価

同ロットプレート 2 枚，異ロットプレート 1 枚を用いて測定した場合の変動係数は，調整濃度 1.5μg/L で 3.6%，3μg/L で 1.5%，15μg/L で 8.0%となり，低濃度側はいずれも 20%以下で概ね良好な結果が得られた。しかし，調整濃度が 30μg/L の場合には 38.1%となり，高濃度側でバラツキがみられる。また，相対値を求めると 179%と大きく，この点も留意する必要がある。

(7) 交差反応性

① 検量線作成記録

本製品における検量線の作成記録は，以下に示すとおりである。

表 5.1.32　**「交差反応性試験」検量線用標準溶液の測定データ**

項目		単位	検量線用標準溶液				
			ﾌﾞﾗﾝｸ	溶液 STD1	溶液 STD2	溶液 STD3	溶液 STD4
所定濃度		μg/L	0	1.5	3	15	30
実測回数		回	3	3	3	3	3
ELISA 実測 B/B0*	1	－	1.039	0.766	0.608	0.243	0.146
	2	－	1.014	0.708	0.592	0.242	0.137
	3	－	0.947	0.708	0.588	0.242	0.137

* 添付標準 0μg/L の平均吸光度を B0 とした。

表 5.1.33　**採用した回帰式係数**[Y = D + (A - D)/(1 + (X / C)^B]

回帰式の係数	A	B	C	D	R^2
値	1.00	1.16	3.45	0.0885	－

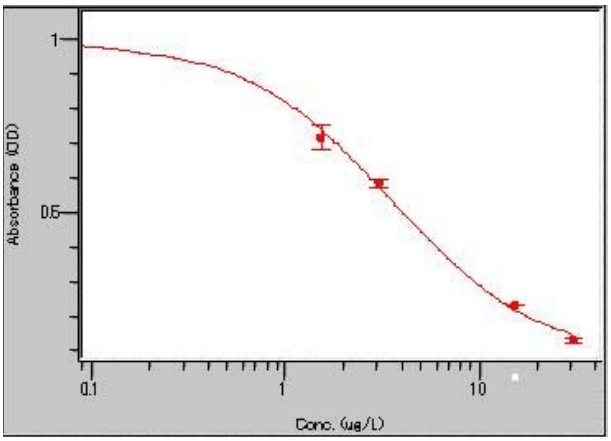

図 5.1.12　**検量線**

② 試験結果記録

本製品における対象物質の測定データは，以下に示すとおりである。

表 5.1.34 **「交差反応性試験」対象物質の交差反応率**

	カルバリル	ペンダイオカルブ	フェントエート	ピリブチカルブ
50%阻害濃度（μg/L)	4.9	17	―	540
交差率(%)	100	29.5	<0.1	0.9

表 5.1.35 **「交差反応性試験」対象物質試料溶液の測定データ**

カルバリル		0μg/L	1.5μg/L	3μg/L	15μg/L	30μg/L		
ELISA 実測 B/B0*	1	1.039	0.739	0.615	0.259	0.144		
	2	1.014	0.744	0.602	0.250	0.137		
	3	0.947	0.711	0.608	0.247	0.140		
平均		1.000	0.731	0.608	0.252	0.140		
標準偏差		0.048	0.018	0.0061	0.0060	0.0033		
CV (%)		4.8	2.4	1.0	2.4	2.4		
ペンダイオカルブ		0μg/L	1.5μg/L	3μg/L	15μg/L	30μg/L	300μg/L	
ELISA 実測 B/B0*	1	1.039	0.861	0.777	0.520	0.355	0.061	
	2	1.014	0.884	0.805	0.513	0.358	0.061	
	3	0.947	0.862	0.799	0.537	0.369	0.064	
平均		1.000	0.869	0.794	0.523	0.361	0.062	
標準偏差		0.048	0.013	0.015	0.012	0.0073	0.0016	
CV (%)		4.8	1.5	1.9	2.3	2.0	2.6	
フェントエート		0μg/L	1.5μg/L	3μg/L	15μg/L	30μg/L	300μg/L	3000μg/L
ELISA 実測 B/B0*	1	1.039	0.913	0.931	0.921	0.970	0.918	0.898
	2	1.014	0.871	0.927	0.934	0.934	0.928	0.908
	3	0.947	0.931	0.909	0.886	0.904	0.881	0.897
平均		1.000	0.905	0.922	0.914	0.936	0.909	0.901
標準偏差		0.048	0.031	0.011	0.025	0.033	0.025	0.0064
CV (%)		4.8	3.4	1.2	2.7	3.5	2.8	0.7
ピリブチカルブ		0μg/L	1.5μg/L	3μg/L	15μg/L	30μg/L	300μg/L	3000μg/L
ELISA 実測 B/B0*	1	1.039	0.874	0.905	0.857	0.833	0.617	0.171
	2	1.014	0.951	0.925	0.916	0.891	0.608	0.172
	3	0.947	0.889	0.875	0.862	0.863	0.615	0.171
平均		1.000	0.905	0.902	0.878	0.862	0.613	0.172
標準偏差		0.048	0.040	0.025	0.032	0.029	0.0043	0.0008
CV (%)		4.8	4.5	2.8	3.7	3.3	0.7	0.5

* 添付標準0μg/Lの平均吸光度をB0とした。

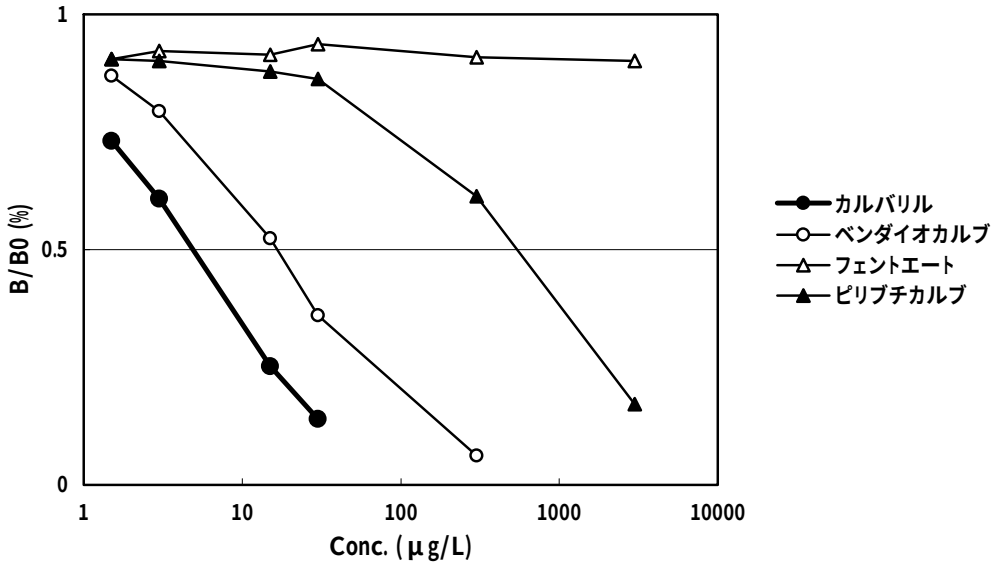

図 5.1.13　**交差反応性試験結果**

評　価

3 類似物質の交差反応率は，ベンダイオカルブ 29.5%，フェントエート<0.1%，ピリブチカルブ 0.9%となり, メーカー申請データに含まれるベンダイオカルブとフェントエートとについては，類似の結果が得られた。

5.2 実用的な性能

(1) 回収特性

① 検量線作成記録

本製品における検量線の作成記録は，以下に示すとおりである。

表 5.2.1 「回収特性試験」検量線用標準溶液の測定データ

項目		単位	検量線用標準溶液				
			ﾌﾞﾗﾝｸ	溶液 STD1	溶液 STD2	溶液 STD3	溶液 STD4
所定濃度		μg/L	0	1.5	3	15	30
実測回数		回	3	3	3	3	3
ELISA 実測 B/B0*	1	－	1.021	0.734	0.612	0.238	0.136
	2	－	1.009	0.736	0.608	0.237	0.138
	3	－	0.970	0.689	0.578	0.235	0.138

* 添付標準 0μg/L の平均吸光度を B0 とした。

表 5.2.2 採用した回帰式係数[Y = D + (A - D)/(1 + (X / C)^B]

回帰式の係数	A	B	C	D	R^2
値	1.00	1.17	3.45	0.0853	－

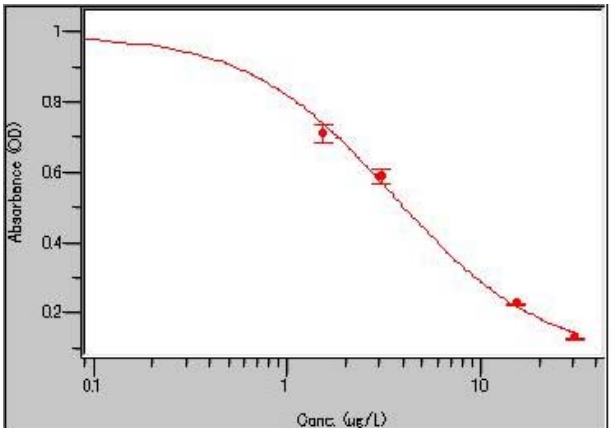

図 5.2.14 検量線

② 試験結果記録

本製品における対象物質の測定データは，以下に示すとおりである。

表 5.2.3 「回収特性試験」対象物質試料溶液の測定データ

項目		単位	河川ろ過水（標準 5μg/L 添加）3)				
フミン酸ナトリウム濃度 1)		mg/L	0	1	5	10	50
実測回数		回	3	3	3	3	3
ELISA 実測 B/B0 2)	1	－	0.451	0.443	0.453	0.444	0.371
	2	－	0.448	0.433	0.440	0.437	0.372
	3	－	0.450	0.458	0.464	0.431	0.381
	平均	－	0.449	0.445	0.452	0.437	0.375
換算値	1	μg/L	4.9	5.0	4.8	5.0	6.8
	2	μg/L	4.9	5.2	5.1	5.2	6.7
	3	μg/L	4.9	4.8	4.6	5.3	6.5
	平均	μg/L	4.9	5.0	4.9	5.2	6.7
標準偏差		μg/L	0.03	0.24	0.23	0.13	0.15
変動係数		%	0.6	4.8	4.8	2.5	2.2
回収影響率		%	98	100	97	103	133

1) 試薬として用いたフミン酸ナトリウム（アクロス社製）の純度表示は 50～60%であるので，その中間値の 55%を純度として用いた。
2) 添付標準 0μg/L の平均吸光度を B0 とした。
3) 篠山川山崎橋河川水。

評　価

対象物質であるカルバリル 5μg/L を河川ろ過水（カルバリル不検出）に添加し，一定濃度のフミン酸ナトリウム共存の影響を試験した結果，フミン酸ナトリウム 50mg/L で多少の正の妨害が認められたが，全体として大きな影響は認められなかった。

(2) 測定精度等

① 検量線作成記録

本製品における検量線の作成記録は，以下に示すとおりである。

表 5.2.4　**「測定精度等試験」検量線用標準溶液の測定データ**

項目		単位	検量線用標準溶液				
			ﾌﾞﾗﾝｸ	溶液 STD1	溶液 STD2	溶液 STD3	溶液 STD4
所定濃度		μg/L	0	1.5	3	15	30
実測回数		回	3	3	3	3	3
ELISA 実測 B/B0*	1	－	1.043	0.771	0.610	0.241	0.150
	2	－	0.958	0.720	0.573	0.235	0.143
	3	－	0.998	0.718	0.581	0.232	0.141

* 添付標準 0μg/L の平均吸光度を B0 とした。

表 5.2.5　**採用した回帰式係数**[Y = D + (A - D)/(1 + (X / C)^B]

回帰式の係数	A	B	C	D	R^2
値	1.00	1.21	3.32	0.101	－

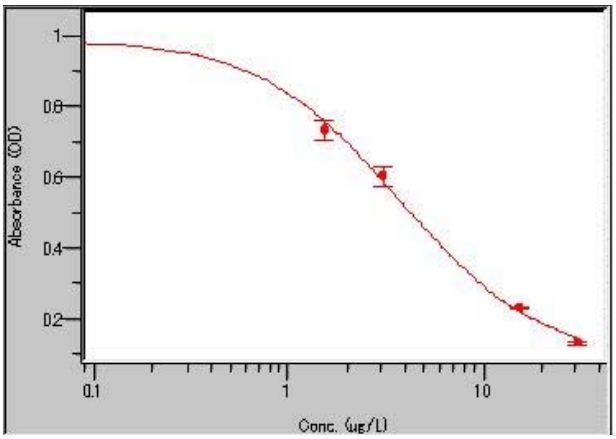

図 5.2.15　**検量線**

② 試験結果記録

本製品における対象物質の測定データは，以下に示すとおりである。

表 5.2.6 **「測定精度等試験」対象物質試料溶液の**ELISA**および**GC/MS**測定データ（標準無添加）**

項目		単位	河川水（標準無添加）			
			杉原川 春日橋	千鳥川 平安橋	美の川 美の川橋	
前処理での濃縮倍率**		倍	100	100	100	
実測回数		回	3	3	3	
ELISA 実測 B/B0*	1	－	0.676	0.631	0.626	
	2	－	0.666	0.617	0.625	
	3	－	0.697	0.632	0.607	
	平均	－	0.680	0.627	0.619	
ELISA 測定濃度 （換算値）	1	μg/L	0.022	0.027	0.027	
	2	μg/L	0.023	0.028	0.027	
	3	μg/L	0.021	0.027	0.029	
	平均	μg/L	0.022	0.027	0.028	
標準偏差		μg/L	0.0014	0.0008	0.0011	
変動係数		%	6.2	3.1	4.0	
GC/MS 測定濃度		μg/L	<0.002	<0.002	<0.002	

* 添付標準 0μg/L の平均吸光度を B0 とした。

** 濃縮方法：コンディショニングを行った Sep-Pak PS-2 および AC-2 の連結カラムに対し，15mL/min で通水して対象物質を吸着する。ジクロロメタン 5mL で溶出，乾固後，メタノール 100μL で溶解し，精製水 900μL を加えて 1mL にした溶液を試料とした。

ELISA の検出下限は 0.47～1.0μg/L，定量下限は 1.6μg/L（無濃縮時）

ELISA の定量下限は 0.016μg/L（100 倍濃縮時）

GC/MS の定量下限は 0.002μg/L（500 倍濃縮時）

表 5.2.7　「測定精度等試験」対象物質試料溶液のELISAおよびGC/MS測定データ（標準添加）

項目		単位	河川水（標準 0.2μg/L 添加）			
			杉原川 春日橋	千鳥川 平安橋	美の川 美の川橋	
前処理での濃縮倍率**		倍	100	100	100	
実測回数		回	3	3	3	
ELISA 実測 B/B0*	1	－	0.239	0.181	0.197	
	2	－	0.252	0.166	0.228	
	3	－	0.233	0.164	0.203	
	平均	－	0.241	0.170	0.210	
ELISA 測定濃度 （換算値）	1	μg/L	0.141	0.231	0.197	
	2	μg/L	0.131	0.273	0.153	
	3	μg/L	0.147	0.281	0.186	
	平均	μg/L	0.140	0.262	0.179	
標準偏差		μg/L	0.0085	0.0266	0.0227	
変動係数		%	6.1	10.2	12.7	
ELISA 回収率		%	70	131	90	
GC/MS 測定濃度		μg/L	0.18	0.23	0.19	
GC/MS 回収率		%	92	114	94	

* 添付標準 0μg/L の平均吸光度を B0 とした。

** 濃縮方法：コンディショニングを行った Sep-Pak PS-2 および AC-2 の連結カラムに対し，15mL/min で通水して対象物質を吸着する。ジクロロメタン 5mL で溶出，乾固後，メタノール 100μL で溶解し，精製水 900μL を加えて 1mL にした溶液を試料とした。

ELISA の検出下限は 0.47～1.0μg/L，定量下限は 1.6μg/L（無濃縮時）

ELISA の定量下限は 0.016μg/L（100 倍濃縮時）

GC/MS の定量下限は 0.002μg/L（500 倍濃縮時）

評　価

3 地点ともに原水をそのまま ELISA キットで測定して検出されず，GC/MS 分析（500 倍濃縮）でも検出されなかったことから，標準を低濃度（0.2μg/L）添加して測定を再度行った。ELISA キットに関しては，原水の 100 倍濃縮試料で，3 地点ともに微量検出される結果が得られ，濃縮によるマトリックスの影響がうかがわれた。添加試料では，変動係数，回収率ともに概ね良好な結果が得られ，GC/MS 分析結果との相関は r=0.992 であった。

6. 実証試験結果の検討と考察

(1) 製品性能の信頼性

実証試験で実施した基本性能 7 項目の結果から, メーカーの申請どおり 1.5〜30μg/L の濃度範囲において概ね妥当な製品性能の信頼性を確認した。ただし, 検量線の曲線部分に当たる特に高濃度側で, 実測濃度（相対値）が高めに出る傾向があり, 留意する必要がある。

(2) 一般環境モニタリングでの実用性

妥当な感度, 精度を有しており, 前処理で適当な濃縮を行えばさらに感度の上昇が期待される。本試験の検討範囲では環境水中のマトリックスの影響は軽微と考えられることから, 実用化は可能である。

(3) 製品操作等の簡便性

一般環境モニタリングでの使用を想定した場合, 試料の前処理から測定結果が得られるまで 4〜5 時間であり, GC/MS 分析と同等であるが, 同時に約 25 試料（3 重測定）の測定が可能となる。したがって, 操作の簡便性は高いと言える。取扱説明書の記述も概ね妥当である。

計 画 書

環境技術実証モデル事業

化学物質に関する簡易モニタリング技術分野

化学物質に関する簡易モニタリング技術
実証試験計画書

環境技術開発者	株式会社　ホリバ・バイオテクノロジー
技術・製品の名称	技術：　　ELISA法（酵素免疫測定法） 製品の名称：　カルバリル測定キットE

平成17年10月3日

兵 庫 県

はじめに

本実証試験計画書は，「化学物質に関する簡易モニタリング技術　実証試験要領第２版（平成 17 年 5 月 16 日　環境省総合環境政策局）」（以下，「実証試験要領」という。）に基づいて選定された実証対象技術について，実証機関および環境技術開発者の 2 者が協議，合意の上，実証試験要領に準じて策定したものである。

（実証機関）

兵庫県立健康環境科学研究センター

所長　　吉村　幸男　　印

（環境技術開発者）

株式会社　ホリバ・バイオテクノロジー

代表取締役社長　　河野　猛　印

目　次

1. 実証試験の概要と目的 ……1
1.1 実証試験の概要と目的 ……1
1.2 実証試験の種類 ……1
2. 実証試験の参加組織と実証試験参加者の責任分掌 ……2
2.1 実証試験の参加組織 ……2
2.2 実施体制 ……2
2.3 実証試験参加者の責任分掌 ……3
3. 実証試験の対象とする化学物質簡易モニタリング技術の概要 ……4
3.1 実証対象製品の原理 ……4
3.2 実証対象製品のデータ ……4
4. 実証試験のデザイン ……6
4.1 実証試験の期間 ……6
4.2 実証試験の内容 ……7
4.3 実証対象製品の受け入れと管理 ……8
4.4 実証試験の方法 ……10
（1）基本的な性能試験 ……11
①測定範囲試験 ……11
②検出下限および定量下限試験 ……11
③繰返し再現性試験 ……12
④日間再現性試験 ……12
⑤期間再現性試験 ……12
⑥プレート間再現性試験 ……12
⑦交差反応性試験 ……12
（2）実用的な性能試験 ……13
①回収特性試験 ……13
②測定精度試験 ……13
5. データの品質管理 ……14
6. データの管理，分析，表示 ……14
6.1 データ管理とその方法 ……14
6.2 データ分析と表示 ……14
7. 評価 ……14

付 録 ：カルバリル物性表
付録１：取扱説明書
付録２：添付資料１－５

1．実証試験の概要と目的

1.1 実証試験の概要と目的

既に適用可能な段階にありながら，環境保全効果等についての客観的な評価が行われていないために普及が進んでいない先進的環境技術について，その環境保全効果等を第三者が客観的に実証する事業をモデル的に実施することにより，環境技術実証の手法･体制の確立を図るとともに，環境技術の普及を促進し，環境保全と環境産業の発展に資することを目的とするものである。

本実証試験は，平成 17 年 5 月 16 日　環境省総合環境政策局が策定した実証試験要領(第 2 版)に基づいて選定された実証対象技術について，同実証試験要領に準拠して実証試験を実施することで，製品性能の信頼性等を客観的に実証するものである。

本実証試験の化学物質簡易モニタリング技術とは，操作・管理の容易性や定量の高感度化などの特徴をもったもので，スクリーニング的な活用や簡易な方法で異常値を監視できることなどへの有用性が期待できるものを指すものとする。

対象とする技術は，一般環境モニタリングでの利活用の可能性を念頭に，以上の条件に該当するものとして，抗原抗体反応を応用した酵素標識免疫測定法（ELISA 法）による簡易分析技術とする。

ここでは，対象とする化学物質から，環境省で別途検討が進められているダイオキシン類を除外するものとする。

1.2 実証試験の種類

本実証試験では，以下の視点から実証を行うものとする。

- 製品性能の信頼性
- 一般環境モニタリングでの実用性
- 製品操作等の簡便性

2．実証試験参加組織と実証試験参加者の責任分掌

2.1 実証試験参加組織

実証試験に参加する組織は，下表に示すとおりである。

表1　実証試験参加組織

実証機関	団体名	兵庫県立健康環境科学研究センター
	住所	〒654-0037　神戸市須磨区行平町 3-1-27
	担当者所属・氏名	安全科学部　研究主幹　古武家善成
	電話番号	078-735-6911
	FAX 番号	078-735-7817
	E-mail アドレス	Yoshinari_kobuke@pref.hyogo.jp
環境技術開発者	企業名	株式会社　ホリバ・バイオテクノロジー
	住所	〒601-8315　京都市南区車道町 48 番地
	担当者所属・氏名	試薬事業部　開発・製造部　伊東　茂壽
	電話番号	075-692-1786
	FAX 番号	075-692-1790
	E-mail アドレス	Shigekazu.ito@horiba.com

2.2 実施体制

実証試験の実施体制は，下図に示すとおりである。

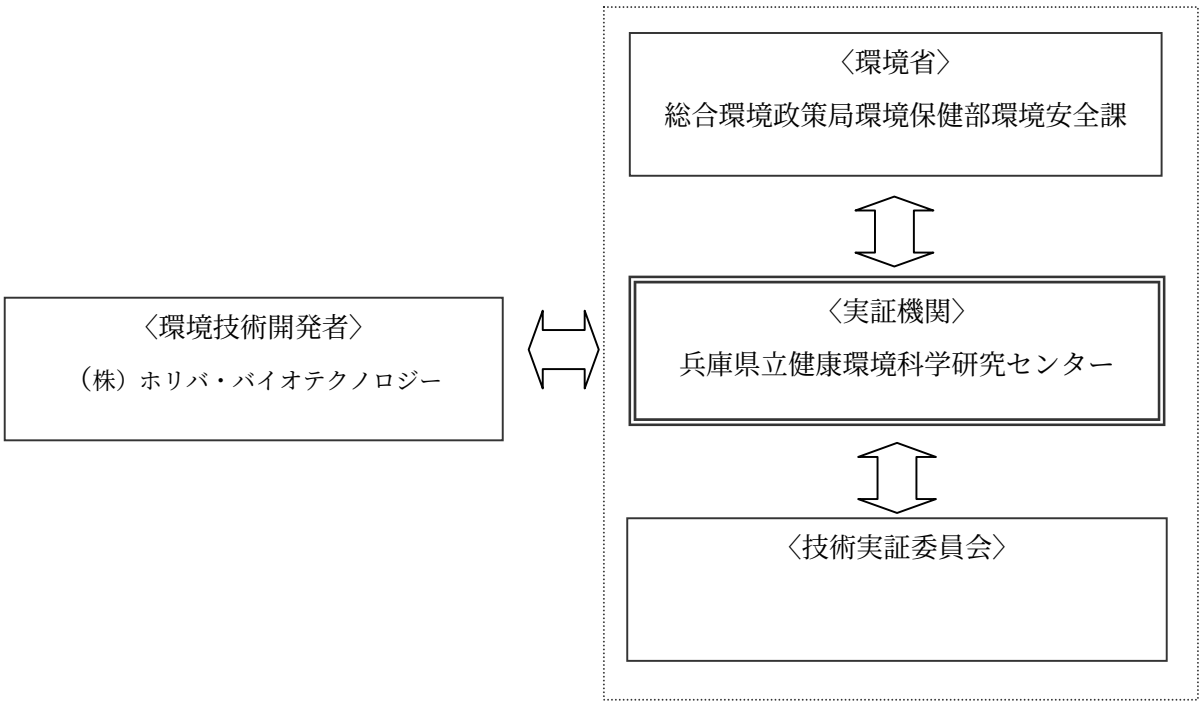

図 1　実証試験の実施体制

2.3 実証試験参加者の責任分掌

実証試験参加者とその責任分掌は，下表に示すとおりである。

表2　実証試験参加者の責任分掌

実証試験参加機関	責任分掌	参加者	
		部署	氏名
実証機関	実証試験の全体の総括責任者	安全科学部長	中野　武
	実証試験における ELISA 法の総括責任者	安全科学部 研究主幹	古武家　善成
	実証試験における ELISA 法担当者	安全科学部 研究員	北本　寛明
	実証試験における機器分析の総括責任者	安全科学部長	中野　武
	実証試験における機器分析担当者	安全科学部 主任研究員	松村　千里
	実証試験における機器分析担当者	安全科学部 主任研究員	吉田　光方子
	実証試験における機器分析担当者	安全科学部 主任研究員	鶴川　正寛
	実証試験における品質管理・内監の総括責任者	企画情報部長	谷本　高敏
	実証試験における品質管理・内監担当者	企画情報部 主任研究員	池沢　正
	実証試験における品質管理・内監担当者	企画情報部 課長補佐	喜多　博子
	実証試験における品質管理・内監担当者	安全科学部 主任研究員	岡田　泰史
環境技術開発者	実証対象製品全体の総括責任者	開発・製造部 部長	伊東　茂壽
	実証対象製品の提供	開発・製造部 次長	門脇　篤
	実証対象製品の取扱説明書等の提供	開発・製造部 部長	伊東　茂壽
	実証試験実施上の参考情報の提供	開発・製造部 次長	門脇　篤

3．実証試験の対象とする化学物質簡易モニタリング技術の概要

3.1 実証対象技術の原理

この実証対象製品は，申請者が開発したカルバリルに対する特異的なモノクローナル抗体を応用した，環境水等のカルバリル測定 ELISA キットである。

この ELISA キットの反応原理は競合反応（カルバリル濃度が高い試料では吸光度が低く，カルバリル濃度が低い試料では吸光度が高い）で，マイクロプレート（96 ウェル）を使用したキットである。

3.2 実証対象製品のデータ

環境技術開発者より提出された実証対象製品のデータは，下表に示すとおりである。

表 3-1　**実証対象製品のデータ** 1

項目	記　入　欄
製品名	カルバリル測定キット E
型番	EL208-01
販売・製造元	販売・製造　：　株式会社　ホリバ・バイオテクノロジー
重量（キット一式，g）	350 g
価格（円）	99,750 円
分析対象物質	カルバリル
対象環境媒体	(水質)・底質・生物・その他（　）
利用用途	環境水その他の水質モニタリング
標準試薬・種類	付属（調整済／(調整要)）
操作環境（室温）	室温（15～25℃）
製品保管条件	4～8℃
製品保証期間	製造後 12 ヶ月間
同時測定数（最多）	46 試料（2 重測定）
測定時間	2~3 時間

表 3-2　実証対象製品のデータ 2

項目	記　入　欄
1. 基本的な性能	
①測定範囲	1.5～30 ppb（添付資料 1）
②検出下限および定量下限	
③繰返し再現性	標準偏差：0.40～1.59，変動係数：6.9～11.4%（添付資料 2）
④日間再現性	標準偏差：0.95～2.30，変動係数：5.7～36.4%（添付資料 2）
⑤期間再現性	保存安定性（添付資料 3）
⑥プレート間再現性	
⑦交差反応性	交差率：　26.1%　（ベンダイオカルブ）　（添付資料 4） 2.8%　（ベンフラカルブ） 2.8%　（フェントエート） 2.1%　（イソプルカルブ） 0.8%　（フェノブカルブ）
⑧その他	
2. 実用的な性能	
①回収特性	回収率：　124.9~144.3 %　（添付資料 5）
②測定精度等	
③その他	
試験責任者	伊東　茂壽
試験年月日	平成 15 年 12 月 27 日

【技術の先進性について】

特開 2000-191624「カルバリルのハプテン化合物，抗体および測定法」

【その他】

カルバリルは「PRTR 法対象物質」，「内分泌撹乱作用の疑われる化学物質」，「水道法水質管理目標設定項目の対象(目標値 0.05mg/L 以下)」，「公共用水等における農薬の水質評価指針(指針値 0.05mg/L 以下)」にリストアップされており，環境水での適応を確認するため申請されたものです。

4. 実証試験のデザイン

4.1 実証試験の期間

実証試験の期間は，平成 18 年 12 月とする。また，その期間のスケジュールは下表に示すとおりである。

表 4　実証試験のスケジュール（予定）

	9 月	10 月			11 月
	1-5 週	1-2 週	3 週	4 週	5 週	1-5 週
実証試験計画の策定						
対象技術の選定，計画書案作成	○	○				
実証試験計画書策定，承認	○	○				
実証試験の実施						
測定範囲の検討			○			
検出限界および定量限界の検討			○			
繰返し再現性の検討			○			
日間再現性の検討			○			
期間再現性の検討			○			
プレート間再現性の検討			○			
交差反応性の検討				○		
回収特性の検討				○	○	
測定精度の検討				○	○	
内部監査の実施					○	
実証試験結果中間報告						○
技術実証委員会の実施						○

4.2 実証試験の内容

実証試験項目の内容は，表 5 のとおりである。

表 5 実証項目の内容

項目	内容
1．基本的な性能	
①測定範囲	提出書類の内容，市販標準品で調製した試験用試料(濃度既知)を用いた ELISA 測定値の変動等に基づき，数値的な設定の妥当性を検討する。
②検出下限び定量下限	提出書類の内容，市販標準品で調製した試験用試料(濃度既知)を用いて同一条件での同一操作の繰返しによる ELISA 測定値の標準偏差等に基づき，数値的な設定の妥当性を検討する。
③繰返し再現性	提出書類の内容，市販標準品で調製した試験用試料(濃度既知)を用いて同一条件での同一操作の繰返しによる ELISA 測定値の標準偏差等に基づき，再現性の妥当性を検討する。
④日間再現性	提出書類の内容，市販標準品で調製した試験用試料(濃度既知)を用いて異なる条件(日付)での同一操作による ELISA 測定値の変動等に基づき，再現性の妥当性を検討する。
⑤期間再現性	提出書類の内容，市販標準品で調製した試験用試料(濃度既知)を用いて製造後一定期間経過した製品の操作性による ELISA 測定値の変動等に基づき，再現性の妥当性を検討する。
⑥プレート間再現性	提出書類の内容，市販標準品で調製した試験用試料(濃度既知)を用いて異なるロットや異なるプレート間での ELISA 測定値の変動等に基づき，再現性の妥当性を検討する。
⑦交差反応性	提出書類の内容，市販標準品で調製した試験用試料(濃度既知)を用いて類似物質別の ELISA 測定値の相違等に基づき，交差反応性を検討する。
2．実用的な性能	
①回収特性	提出書類の内容，環境試料を模擬し市販標準品で混合調製した試験用試料(濃度既知)を用いた ELISA 測定値の比較等に基づき，回収特性を検討する。
②測定精度	環境試料(濃度未知)を用いた ELISA 測定値の変動や操作手順・操作方法の特徴等に基づき，測定精度，前処理妥当性，操作簡便性等による環境試料への適用性を検討する。

4.3 実証対象製品の受け入れと管理

（1）実証対象製品（ELISA キット）の受け入れ

ELISA キット受領時の状態について，搬入者の立ち会いの元に，受領の記録を ELISA キット管理表（様式 1）に記入し，以下の事項を確認する。

- 管理表と ELISA キットの品名，数量が一致していること。
- ELISA キットの搬送が適切に取り扱われていること。
- ELISA キットに不適合又は疑義を発見したときは，搬入者と協議し適切な処置をとる。

（2）ELISA キットの管理

- ELISA キットは，変質しないように，取扱説明書に記載された保管条件で適切に保管・管理する。
- ELISA キットの分轄を行う場合は，汚染や品質低下のない方法で行い，識別番号等必要な表示を行うとともに，分轄の年月日その他必要な事項を管理表に記録する。

ELISA キット管理表（様式 1）

受領年月日　　月　　日　　時　　分　　搬入者

番号（管理番号）　　－

メーカー名　　株式会社　ホリバ・バイオテクノロジー

品名　　カルバリル測定キット E

Lot. No.

搬入時確認事項

- □ 包装等に破損がない　　保管場所
- □ 保管温度（　　℃）　　保管温度　　℃
- □ 搬入時の温度管理
- □ 使用期限
- □ その他異常なし

受領者

（移動・分轄等の記録）

4.4 実証試験の方法

基本的な性能試験および実用的な性能試験において，以下の操作は共通である。

a. 製品の操作

製品の操作にあたっては，製品の取扱説明書を遵守するとともに，「化学物質簡易モニタリング実証試験　品質管理マニュアル」（付録 4）の試験操作手順（一般的な事項）に従って行う。

b. 検量線作成用標準溶液の調製

キットに付属する標準物質を用い，キットが指定する希釈濃度系列（以下，指定濃度系列）を作成する。

c. 吸光度の測定

指定濃度系列および各試験用試料溶液の吸光度は，マイクロプレートリーダー（バイオ・ラッド社マイクロプレートリーダー　モデル 680）で測定する。

d. 検量線の作成

プレート毎に同時に測定したブランク（添付の希釈液等）および標準溶液指定濃度系列の吸光度（3 重測定の平均値）から，キットの指示に従い検量線を作成する。

e. 実測濃度の算出

d.で作成した検量線を用いて，各試験用試料溶液の吸光度から各実測濃度を算出する。